

MANUFACTURING METHOD OF DRY ANALYSIS ELEMENT**Publication number:** JP2002350437**Publication date:** 2002-12-04**Inventor:** SAITO HITOMI; AMANO YOSHIKAZU**Applicant:** FUJI PHOTO FILM CO LTD**Classification:**

- **international:** G01N31/22; G01N21/78; G01N33/52; G01N31/22;
G01N21/77; G01N33/52; (IPC1-7): G01N33/52;
G01N21/78; G01N31/22

- **european:**

Application number: JP20010160654 20010529**Priority number(s):** JP20010160654 20010529**Report a data error here****Abstract of JP2002350437**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a manufacturing method of a dry analysis element capable of preventing coloring of a leuco pigment even if an antifogging agent is not used in manufacture of the dry analysis element, and also preventing coloring thereafter before being used. **SOLUTION:** This manufacturing method of the dry analysis element is characterized by integrating the fading leuco pigment as a layer having pH of 5-12 into the dry analysis element, and executing aging there after.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

Best Available Copy

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-350437

(P2002-350437A)

(43)公開日 平成14年12月4日 (2002.12.4)

(51)Int.Cl.
G 0 1 N 33/52
21/78
31/22

識別記号
1 2 1

F I
C 0 1 N 33/52
21/78
31/22

テ-マコ-ト*(参考)
B 2 G 0 4 2
A 2 G 0 4 5
1 2 1 P 2 G 0 5 4

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 頁)

(21)出願番号

特願2001-160654(P2001-160654)

(22)出願日

平成13年5月29日 (2001.5.29)

(71)出願人 000005201

富士写真フィルム株式会社
神奈川県南足柄市中沼210番地

(72)発明者 斎藤 仁美

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フィルム株式会社内

(72)発明者 天野 芳和

埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号 富士写
真フィルム株式会社内

(74)代理人 100085109

弁理士 田中 政浩

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 乾式分析素子の製造方法

(57)【要約】

【課題】 乾式分析素子の製造の際にカブリ防止剤を使用しなくともロイコ色素が発色してしまうことがなく、その後も使用前に発色してしまうことのない乾式分析素子の製造方法を提供する。

【解決手段】 上記課題は、褪色するロイコ色素をpHが5～12の層として乾式分析素子に組み込み、その後エージングを行うことを特徴とする、乾式分析素子の製造方法によって解決される。

Best Available Copy

!(2) 002-350437 (P2002-350437A)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 褪色するロイコ色素を乾式分析素子に組み込み、その後加熱によりエージングを行うことを特徴とする、乾式分析素子の製造方法

【請求項2】 ロイコ色素の層のpHが5～12である、請求項1に記載の乾式分析素子の製造方法

【請求項3】 エージング温度が30℃～70℃である、請求項1に記載の乾式分析素子の製造方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、過酸化水素やこれを用いるペルオキシダーゼによってロイコ色素を発色させて定量を行う乾式分析素子の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 近年、臨床検査における酵素学的分析方法は、その特異性が高く評価され、急速に普及しつつある。それらのうち、尿および体液中のグリコース、尿酸、コレステロール、トリグリセリド、乳酸、クレアチニン、遊離脂肪酸、グルタミン酸ピルビン酸トランスマニナーゼ、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスマニナーゼ、コリンエステラーゼ、クレアチニンホスホキナーゼ、乳酸脱水素酵素などを測定する方法としてそれぞれの系における最終的に定量すべき物質の酸化酵素を作用させて生成した過酸化水素を定量することにより、目的物を定量する方法がしばしば用いられている。

【0003】 これらの方法はペルオキシダーゼの存在下に、o-トリジン、2,7-ジアミノフルオレン、N,N-ジメチル-p-フェニレンジアミン、o-ジアニジン、o-アミノフェノール、等の色原体を酸化型の発色体に変化させて比色定量する方法、4-アミノアンチビリンとフェノール又はN,N-ジアルキルアニリンあるいはN,N-ジアルキルトライジンとの組み合わせ、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンとo-トリジン又はN,N-ジメチルアニリンあるいはN,N-ジエチルアニリンとの組み合わせ、あるいは二量体を形成する4-メトキシ-1-ナフトール及びその誘導体等の色原体を酸化縮合させて発色体として比色定量する方法等である。さらに、褪色するロイコ色素を発色体として組み込んだ乾式分析素子も公知である（特開昭59-193352号公報）。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 上記のロイコ色素を組み込んで乾式分析素子を製造する際に塗布を繰り返して多層を形成している間にロイコ色素が発色してカブリを生じることがあった。そのため従来はカブリ防止剤を使用していた。しかし、カブリ防止剤は酸素活性を阻害する問題がある。また、原料ロットの差や塗布のバラツキを受けやすく、カブリが安定しない。さらに自然経時によりロイコ色素が発色し、正確度が変動する問題もある。

る。

【0005】 本発明の目的は、乾式分析素子の製造の際にカブリ防止剤を使用しなくともロイコ色素が発色してしまうことがなく、その後も使用前に発色してしまうことのない乾式分析素子の製造方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記課題を解決するべく鋭意検討の結果、ロイコ色素を特定のpHの溶液として塗布し、その後加熱によりエージングを行うことによってカブリを消失させることができ、さらにカブリを生じさせずに保存できることを見出した。

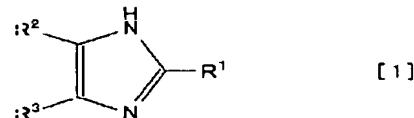
【0007】 本発明は、かかる知見に基づいてなされたものであり、褪色するロイコ色素をpHが5～12の溶液として乾式分析素子に組み込む、または、ロイコ色素の層に上層からpHを調整して上層から積層によりロイコの層のpHの調整をしてもよい。その後30～70℃でエージングを行うことを特徴とする、乾式分析素子の製造方法に関するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】 本発明が適用されるロイコ色素は、4位と5位が非対称であり、4位と5位のどちらか一方又は両方に窒素含有基がないものである。

【0009】 このロイコ色素は下記の一般式【1】で表されるイミダゾール誘導体である。

【化1】



【0010】 式【1】において、R¹はオルト位またはパラ位がヒドロキシル基で置換されたアリール基を、R²はアリール基または置換アリール基を、R³はアルキル基、置換アルキル基またはアルケニル基を、それぞれ表す。

【0011】 一般式【1】のR¹で表されるヒドロキシアリール基はヒドロキシル基のほかにハロゲン原子（塩素原子、臭素原子など）、シアノ基、アルコキシ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基などの置換基を1個、または同種または異種のこれらの置換基を2個以上有してもよい。R²で表される置換アリール基はハロゲン原子（塩素原子、臭素原子など）、ヒドロキシル基、シアノ基、アルコキシ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基などの置換基を1個、または同種または異種のこれらの置換基を2個以上有するアリール基である。

【0012】 R³で表される置換アルキル基は、ヒドロキシル基、アルコキシ基、アリールオキシ基、シアノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、カル

Best Available Copy

:(3) 002-350437 (P2002-350437A)

ボキシル基、アルコキシカルボニル基、カルバモイル基、N-アルキルカルバモイル基、N, N-ジアルキルカルバモイル基、アルキルスルホニル基、スルファモイル基、N-アルキルスルファモイル基、N, N-ジアルキルスルファモイル基、アリール基などの置換基を1個、または同種または異種のこれらの置換基を2個以上有するアルキル基であり、これらのうちではアリール基、アリールオキシ基が好ましい。

【0013】R³ がアルキルの場合、その炭素原子数はいくつでもよいが、好ましくは2個以上、最も好ましくは6個以上であり、また炭素原子数が3個以上の場合、炭素鎖は直線状、分岐状、環状のいずれでもよい。R³ がアルケニルの場合、その炭素原子数は2個以上であればいくつでもよいが、好ましくは6個以上であり、また炭素原子数が3個以上の場合、炭素鎖は直線状、分岐状のいずれでもよく、炭素原子数が5個以上の場合には環状であってもよい。

【0014】R¹ で表される置換アリール基の好ましい具体例は、2-ヒドロキシフェニル基、4-ヒドロキシフェニル基、3, 5-ジプロモ-4-ヒドロキシフェニル基、3-ブロモ-4-ヒドロキシ-5-メトキシフェニル基、3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル基、3, 5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル基などである。

【0015】R² で表される置換基の好ましい具体例は、フェニル基、4-メトキシフェニル基、4-エトキシフェニル基、4-(ジメチルアミノ)フェニル基、4-

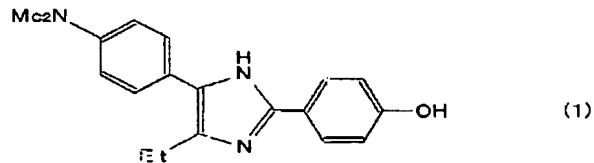
- (ジエチルアミノ)フェニル基など、および前記のR¹ で表される置換基の好ましい具体例としてあげた基などである。

【0016】R³ がアルキル基の場合、その好ましい具体例は、エチル基、プロピル基、ブチル基、ヘキシル基、オクチル基、デシル基、イソプロピル基、イソアミル基、シクロヘキシル基、シクロヘキシルメチル基、シクロヘキシルエチル基などがあり、これらのうちで最も好ましいものは、オクチル基、デシル基、シクロヘキシルエチル基などである。R³ が置換アルキル基の場合、その好ましい具体例は、ベンジル基、フェネチル基、3-フェニルプロピル基、フェノキシメチル基、2-フェノキシエチル基、3-フェノキシプロピル基などがあり、これらのうちでフェネチル基、3-フェニルプロピル基、2-フェノキシエチル基、3-フェノキシプロピル基などが水に易溶性でかつ多層化学分析要素に配合された場合に層間拡散の少ない化合物を与える点で最も好ましい。

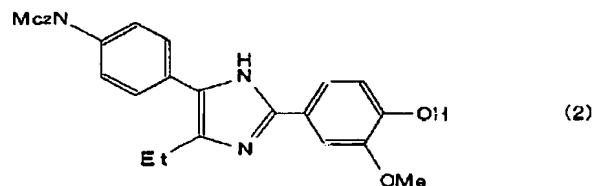
【0017】R³ がアルケニル基の場合、その好ましい具体例は、3-ブチニル基、4-ベンテニル基、3-ヘキセニル基がある。

【0018】次に一般式(1)で表される化合物の好ましい具体例を示すが、本発明に用いられる化合物はこれらの化合物のみに限定されるものではない。なお、以下でM_cはメチル基、E_tはエチル基、Phはフェニル基、B₂はベンジル基を表す。

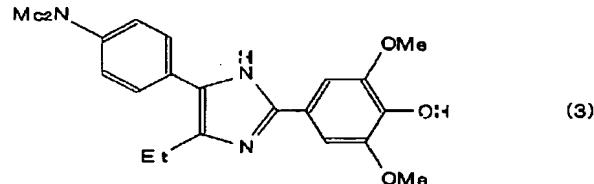
【化2】



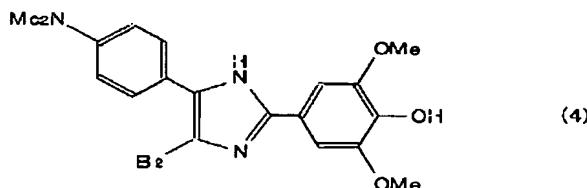
【化3】



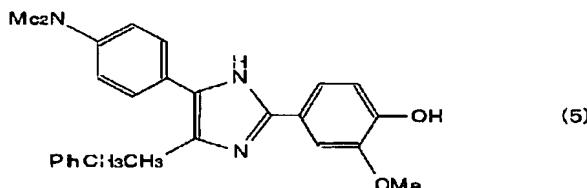
【化4】



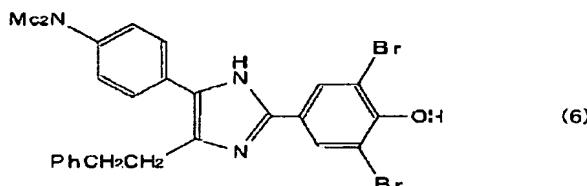
【化5】



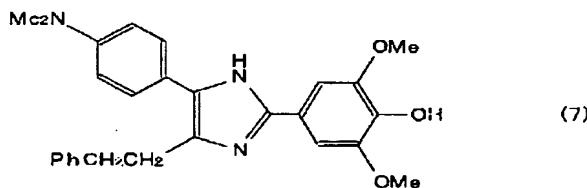
【化6】



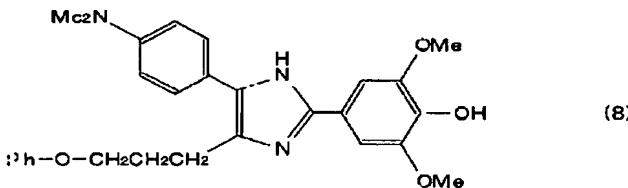
【化7】



【化8】



【化9】



【0019】これらの化合物のうちでは化合物(7)が水に対する溶解度が大きく、かつ多層化学分析要素に配合された場合に層間拡散が少ないので好ましい。

【0020】ロイコ色素は水溶性のものはそのまま水に溶かし、そうでないものは一旦、アセトン、ジメチルホルムアミド、メタノール、エタノール等の水溶性有機溶剤に溶かしてから水に加えて水溶液又は懸濁液とする。ロイコ色素の濃度は0.05%~2%程度、好ましくは0.1~1%程度が適当である。このロイコ色素の溶液はpHが5~12程度、好ましくはpHが6~11程度、特に好ましくはpHが7~9.5程度とする。

【0021】そのために、pH緩衝剤を用いることが好ましい。pH緩衝剤の例としては、リン酸緩衝液、イミダゾール緩衝液、ピロリン酸、トリス、2-アミノ・メタンプロパン1・3ジオール緩衝液、ホウ酸、グリシン、炭酸ナトリウム、等を挙げることができる。

【0022】ロイコ色素はペルオキシダーゼの作用で過酸化水素と反応して発色するものであるから、ペルオキシダーゼも乾式分析素子に組み込む必要がある。また、ロイコ色素を含有させる層が塗布層である場合にはゼラチン等の親水性ポリマーバインダーも必要である。これらはロイコ色素と同じ溶液と含有させてもよく、別の溶液であってもよい。同じ溶液とする場合には、ペルオキシダーゼの濃度は5~200KU/L程度、好ましくは50~100KU/L程度、そして親水性ポリマーバインダーの濃度は1~30%程度、好ましくは5~25%程度が適当である。

【0023】そのほか、分析対象に応じた酸化酵素も加える。すなわち、最終的に定量すべき物質が酸化酵素の作用により過酸化水素を生成する場合に、酸化酵素を本発明の試薬系に組み合わせることによって、生成する過酸化水素を定量して目的とする種々の物質を定量するこ

Best Available Copy

:(5) 002-350437 (P2002-350437A)

とが可能になる。具体的には、尿および液体（例：血液）の中のグルコース、尿酸、コレステロール、トリグリセリド、乳酸、クレアチニン、遊離脂肪酸、グルタミン酸ビルピン酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ、コリンエスチラーゼ、クレアチニンホスホキナーゼ、乳酸脱水素酵素などを測定することができる。これらの測定に用いる酸化酵素としては、グルコースオキシダーゼ、ウリカーゼ、コレステロールオキシダーゼ、L- α -グリセロ磷酸オキシダーゼ、ビルピン酸オキシダーゼなどが挙げられる。また、界面活性剤（好ましくはノニオン性界面活性剤（例：ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル等））を用いることも好ましい。

【0024】本発明の分析素子の基本構成は、水不透過性透明支持体の上に、水浸透性層および多孔性展開層が、この順に積層されてなる。

【0025】多孔性展開層は、水性の検体に含有されている成分を実質的に偏在させることなしに平面的に拡げ、単位面積当たりほぼ一定量の割合で水浸透性層に供給する機能を有する層であり、これまで乾式分析素子に使われている展開層として、公知の非纖維質及び纖維質の全ての多孔性材料を用いることができる。具体的には特開昭49-53888に開示されているメンブランフィルター（プラッシュドポリマー）に代表される非纖維性等方的微多孔質媒体層、特開昭55-90859等に開示されたポリマーミクロビーズが水不膨潤性の接着剤で点接触状に接着されて成る連続空隙含有三次元格子粒状構造物層に代表される非纖維性多孔性層、特開昭55-164356、同57-66359等に開示された織物布地からなる多孔性層、同60-222769等に開示された編物布地からなる層等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0026】例えば、セルロース誘導体（D AC, TA C, NC, HMC（ヒドロキシメチルセルロース）、HEC（ヒドロキシエチルセルロース））の多孔質膜、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、塩化ビニール等のエチレン重合体または共重合体で作られた多孔質膜、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリスルホン等で作られた多孔質膜、アクリル酸やメタクリル酸、これらのエステルのビニル重合体または共重合体から成る多孔質膜、ナイロン、ポリアミド、ポリウレタン等の縮合重合体の多孔膜、ガラス粒子、けい藻土等の無機材料微粒子を少量のポリマーで結合させて作られた多孔性膜、ポリテトラフルオロエチレンで作られた多孔性膜、涙紙、ガラス繊維涙紙等がある。

【0027】展開層は、1層だけに限定する必要はなく、特開昭61-4959、同62-138756、同62-135757、同62-138758等に開示されている様に、2層以上の層を重ねて用いることができる。

【0028】展開層中には、検体の展開を促進するためには、ノニオン、アニオン、カチオンもしくは両性の界面活性剤を含ませることができる。

【0029】また、展開性をコントロールする目的で、親水性のポリマー等の展開制御剤を含ませることができる。

【0030】更に、目的とする検出反応を促進する為の、あるいは干渉、妨害反応を低減、阻止する為の各種試薬、もしくは試薬の1部を含ませることができる。

【0031】展開層の厚さは、20～300 μ m、好ましくは50～270 μ m、更に好ましくは80～250 μ mである。

【0032】水浸透性層の代表的な層である親水性ポリマー層は、通常分析に必要な試薬の少なくとも1部を含んでおり、その場合、この層は試薬層と称される。この層にはこれまで乾式分析素子に使われている公知の水に可溶性、膨潤性、親水性の各種ポリマーを用いることができる。水吸収時の膨潤率が30℃で約150%から約2000%、好ましくは約250%から約1500%の範囲の天然又は合成親水性ポリマーを使用することができ、具体的には、特開昭59-171864、同60-108753等に開示されたゼラチン（例えば、酸処理ゼラチン、脱イオンゼラチン等）、ゼラチン誘導体（例えば、フタル化ゼラチン、ヒドロキシアクリレートグラフトゼラチン等）、アガロース、ブルラン、ブルラン誘導体、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0033】親水性ポリマー層に代えて、ポリマー多孔質膜等を用いることもできる。

【0034】親水性ポリマー層の厚さは、乾燥時に約1 μ m～約100 μ m、好ましくは約3 μ m～約50 μ m、特に好ましくは約5 μ m～約30 μ mであり、実質的に透明であることが好ましい。

【0035】親水性ポリマー層中には、目的とする反応を促進する、もしくは干渉、妨害反応を防止、低減するための各種試薬もしくは試薬の1部を含ませることができる。

【0036】水不透過性透明支持体としては、これまで乾式分析素子に使われている公知の水不透過性の透明支持体を用いることができる。具体的には、ポリエチレンテレフタレート、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、セルロースエステル（例えば、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、セルロースアセテートプロピオネート等）等から成る厚さ約50 μ m～1mm、好ましくは約80 μ m～約300 μ mの透明フィルムを用いることができる。

【0037】支持体の表面には、必要により公知の下塗層もしくは接着層を設けて、親水性ポリマー層との接着を強固にことができる。

Best Available Copy

!(6) 002-350437 (P2002-350437A)

【0038】乾式分析素子には、分析項目等に応じてさらに各種の層が組込まれる。例えば検出層、吸水層、光反射層、光遮蔽層等である。

【0039】ロイコ色素は、前記の親水性ポリマー層に含有させるが、展開層に含有させることもできる。

【0040】各層の積層が終了したら、次にエージングを行う。このエージングは、常圧または減圧雰囲気で、30~70°C程度、好ましくは35~60°C程度、特に

反応層

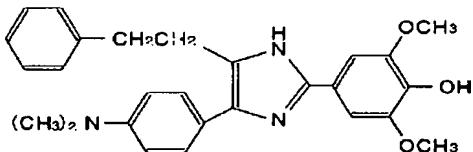
ゼラチン
ペルオキシダーゼ
ビルビン酸オキシダーゼ
ロイコ色素

【0042】この反応層の上にポリエチレンテレフタレート織物からなる厚さ250μmの展開布をラミネート
緩衝剤(pH8.0)
界面活性剤

【0043】ここで、界面活性剤は、ポリオキシ(2-ヒドロキシ)プロピレンノニルフェニルエーテル(「Surfactant 10G」、オーリン社製)を、ロイコ色素は、2-(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-4-(4-ジメチルアミノフェニル)-5-フェネチルイミダゾール酢酸塩を、緩衝剤にはトリスヒドロキシメチルアミノメタンを、それぞれ用いた。

【0044】上記のロイコ色素の構造式を次式に示す。

【化10】



【0045】上記の一体型多層分析素子を恒温室で温度40°C、6時間のエージングを実施した。

【0046】上記の一体型多層分析素子を12mm×13mm四方のチップに切断し、スライド枠(特開昭57-63452号公報に記載)に納めて、本発明に従うPYR分析用乾式スライド(1)を作製した。

【0047】[比較例1]ロイコ色素を下記のものに変えたほかは実施例1と同様にして一体型多層分析素子を作製した。

【化11】

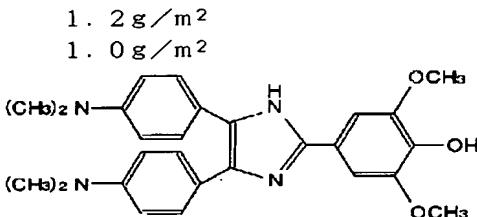
好ましくは45~55°C程度で、1~72時間程度、好ましくは6~24時間程度行う。

【0041】

【実施例】[実施例1]ゼラチン下塗りされている180μmのポリエチレンテレフタレート無色透明平滑フィルムに下記組成の水溶液を、乾燥後の厚さが20μmになるように塗布し、常温で減圧乾燥した。

20.0g/m²
15.0kU/m²
3.0kU/m²
0.3g/m²
pH8.0

し、下記組成の水溶液を塗布して常温で減圧乾燥した。



【0048】[実施例2]エージングの温度を変えて実施例1と同様にして一体型多層分析素子を製造した。

【0049】[実施例3]ロイコ色素溶液のpHを変えて実施例1と同様にして一体型多層分析素子を製造した。

【0050】[測定例1]上記のスライドを用いて次の測定を行った。

(1) エージングの温度とカブリの強度

エージングの温度を変えて実施例1と同様にして製造した一体型多層分析素子のカブリと測定レンジを測定した結果を表1に示す。

(2) ロイコ色素水溶液のpHを変えて実施例1と同様にして製造した一体型多層分析素子のカブリの強さを測定した結果を表2に示す。褪色するロイコ色素を用いると、pHが5~12でカブリが低値安定する。

(3) 比較例1の一体型多層分析素子のカブリと測定レンジを測定した結果を表3に示す。

【0051】

【表1】

エージング 条件	エージング 無し	温 度		
		25°C	40°C	60°C
カブリ	1.22	1.00	0.29	0.27
レンジ	0.35	0.62	0.91	0.89

【0052】

【表2】

pH	pH=4.0	pH=6.0	pH=8.0	pH=10
カブリ	1.07	0.42	0.30	0.26
レンジ	0.59	0.86	0.91	0.83

【0053】

【表3】

	実施例1	比較例1
カブリ	0.29	0.90
レンジ	0.91	0.45

【0054】

【発明の効果】本発明により、カブリ防止剤を使用しないでロイコ色素を用いた乾式分析素子のカブリを除去して分析精度を高めることができる。また、保存時の安定性も高めることができる。

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G042 AA01 BD19 CA10 CB03 DA10
FA11 FB07 FC03
2G045 AA16 AA25 BA11 BB51 BB60
CB03 DA31 FB01 FB11 GC12
HA10
2G054 AA07 AB02 AB05 BA01 BB13
CA21 CE01 GE06

Best Available Copy